

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕОТРОПИНА И ДИМЕРЭТЕЛЕНИМИНА ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ ЭШЕРИХИЙ И ИХ ТОКСИНОВ

<sup>1</sup>МЕДВЕДЕВ А.П., <sup>2</sup>КУЛЕШОВ Д.Б.

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ОАО «БелВитунифарм», д. Должа Витебского района, Республика Беларусь

*В статье приведены результаты исследований по возможности применения теотропина и димерэтиленимина для инактивации эшерихий и их токсинов. Установлены высокая бактерицидная и бактериостатическая активность упомянутых веществ в отношении бактерий и их токсинов. Более эффективным инактиватором, чем теотропин, является димерэтиленглюцин, это вещество в течении 4-х часов оказывает бактерицидное действие на эшерихий, а в течении 5-и часов полностью инактивирует их токсины.*

**Ключевые слова:** эшерихии, токсины, теотропин, димерэтиленимин, инактиваторы, экспозиция, полнота инактивации, бактерицидная и бактериостатическая активность инактиваторов.

## DETERMINATION OF THE POSSIBILITY OF USING THEOTROPIN AND DIMERETHYLENIMINE FOR INACTIVATION OF ESCHERICHIA AND THEIR TOXINS

<sup>1</sup>Medvedev A.P., <sup>2</sup>Kuleshov D.B.

<sup>1</sup>Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>JSC "BelVitunifarm", Dolzha village, Vitebsk region, Republic of Belarus

*The article presents the results of studies on the possible use of theotropin and ethylenimine dimer for the inactivation of Escherichia and their toxins. The high bactericidal and bacteriostatic activity of the mentioned substances against bacteria and their toxins has been established. A more effective inactivant than theotropin is dimerethylene glucin, this substance has a bactericidal effect on Escherichia within 4 hours, and within 5 hours completely inactivates their toxins.*

**Keywords:** escherichia, toxins, theotropin, dimerethylenimine, inactivants, exposure, completeness of inactivation, bactericidal and bacteriostatic activity of inactivants.

**Введение.** В борьбе с инфекционными болезнями животных большое значение имеет профилактика их с помощью вакцин и лечение животных специфическими сыворотками. Получение их, в том числе, и против эшерихиоза представляет собой сложный многоэтапный процесс. В технологии промышленного производства противозэшерихиозных инактивированных препаратов важное значение имеет инактивация выращенной бактериальной массы эшерихий и их токсинов. Чаще всего для инактивации бактерий и их токсинов применяют формалин, содержащий не менее 36% формальдегида. К культуре эшерихий его добавляют из расчёта 0,3-0,4% и процесс инактивации проводят в течении 20-25 суток.

Однако, этот способ имеет некоторые недостатки к которым относят: его длительность, возможное нарушение антигенной структуры эшерихий и, в этой связи, снижение иммуногенной активности бактериальных антигенов в составе препаратов для профилактики эшерихиоза. Кроме этого, формалин обладает токсичностью, реактогенностью, угнетает деятельность иммунной системы.

Известно, что для инактивации культур бактерий используют различные физические и химические средства: нагревание, спирт, кислоты, тиомерсал и т.д.

При знакомстве с литературой по затронутому вопросу, наше внимание привлекли теотропин и димерэтиленимин. Теотропин представляет собой порошок желтоватого цвета со слабым специфическим запахом. Вещество обладает стабильностью и не утрачивает своих свойств при нагревании и длительном замерзании т.е. при воздействии температуры до 196°C и хранении при 40°C в течении 10 лет. Теотропин хорошо растворим в воде, спирте, ацетоне. Он не раздражает кожу, слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, мочеполовой системы.

Водный раствор димерэтиленимина представляет собой прозрачную бесцветную жидкость. Массовая доля вещества в растворе не менее 15%, водный показатель не более 13%.

Целью исследований являлось определение возможности применения теотропина и водного раствора димерэтиленимина для инактивации культур эшерихий и их токсинов, предназначенных для

изготовления антигена с последующим применением его для гипериммунизации волов продуцентов специфической сыворотки.

**Материалы и методы исследований.** В исследовательской работе были задействованы холодильник бытовой, микроскоп МБИ-2, центрифуга лабораторная ЦЛС-3, весы чашечные с разновесами, термостат, водяная баня, пипетки пастеровские, петли бактериологические, стекла предметные, пробирки, чашки Петри, анилиновые краски для окрашивания бактерий п Грамму, жидкие, полужидкие и плотные питательные среды, стандарты мутности на 0,5 и 1,0 млрд. микробных клеток, теотропин порошкообразный, производственные штаммы эшерихий, принадлежащие в серогруппам (08, 09, 015, 020, 026, 041, 055, 078, 0101, 0115, 0117, 0139, 0141), которые хранили в полужидком агаре в холодильнике при температуре +2°C.

Репродукцию штаммов проводили путём высева эшерихий в МПБ и выращивание их в термостате при 37 °С в течение суток. Для определения культуральных свойств эшерихий их высевали в жидкие, полужидкие и на плотные питательные среды, выращивали в течение суток при 37°C, а затем изучаем характер роста бактерий на этих средах.

Тинкториально-морфологические признаки эшерихий определяли микроскопией препаратов-мазков, окрашенных по Граму, биохимическую активность эшерихий изучали общепринятыми методами в микробиологической практике, используя жидкие, полужидкие среды Гисса и другие.

Антигенную структуру бактерий определяли в реакции агглютинации, которую ставили с применением специфических сывороток. Постановку реакции осуществляли в соответствии с наставлением на их применению.

Опытную работу по инаktivации эшерихий проводили с культурами бактерий, выращенных в МПБ. Теотропин добавляли в культуру в количестве 5 мг/см<sup>3</sup>, 10 мг/см<sup>3</sup> и 12 мг/см<sup>3</sup> и вели инаktivацию в течение 20 часов при 37-38°C.

Для апробации димерэтиленимина в качестве инаktivанта раствор вещества добавляли к культурам эшерихий в количестве 0,1% и 0,2%, а затем инаktivацию вели в течении 20 часов при температуре 37-38°C.

В качестве контрольного варианта проводили инаktivацию культур эшерихий формалином, добавляя к ним инаktivант из расчёта 0,3% и выдерживая их в течение 20 суток при 37-38°C.

Бактерицидную и бактериостатическую активность инаktivантов изучали путем сравнения характера роста бактерий в средах с добавлением веществ и в контрольных средствах без их внесения. Кроме этого из пробирок, в которых отсутствовал рост, делали высевы в жидкие среды с последующим выдерживанием их в термостате при 37°C в течение 10 суток, что бы убедиться в полной инаktivации эшерихий и подтвердить высокую бактерицидную активность инаktivантов .

В экспериментах использовали скульптуры эшерихий, выращенные в одинаковых условиях, в одной и той же жидкой питательной среде (МПБ)

Инаktivации подвергали культуры эшерихий в концентрации 5 млрд/см<sup>3</sup>. Спустя 2,4,6,8,10,12,14,16,18 и 20 часов после добавления инаktivантов к культурам делали высева в МПБ с целью определения продолжительности периода воздействия инаktivировующих веществ на бактерии, в течение которого происходит их полная инаktivации.

Полноту инаktivации токсинов эшерихий под воздействием теотропина и димерэтиленимина, культур бактерий проверяли путём инъекции их в дозе 0,5 см<sup>3</sup> мышам массой 16-18 г и наблюдали за ними в течение 48 часов. В опытах использовали культуры, экспозиция инаktivации которых составляло 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 часов.

**Результаты исследований.** При микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Грамму было установлено, что эшерихии представляют собой палочки с закругленными концами шириной 0,7-1,5 мкм, длиной 2-5 мкм. Эшерихии были грамотрицательными. Капсулу обнаружили у штаммов 08, 09, 0101. Бактерии, выращенные на МПА, имели меньше размеры, чем выращенные в МПБ.

При росте в жидкой питательной среде эшерихии вызывали её помутнение и образование на дне пробирки через 18-20 часов серо-белого осадка. Концентрация микробных клеток достигла до 2 млрд/см<sup>3</sup>.

На поверхности МПА эшерихии формировали колонки от 1 до 4 мм. в диаметре , серо-белого цвета.

Биохимическая активность эшерихий характеризовалась следующими признаками. Бактерии образовывали индол, сероводород, ферментировали с образованием кислоты и газа, лактозу, глюкозу, мальтозу, маннит, арабинозу, галаткозу. На среде Эндо эшерихии формировали круглые колонки малинового цвета с металлическим блеском. На среде Левина колонки были окрашены в фиолетовый цвет.

Все варианты эшерихий в РА с диагностическими сыворотками давали положительную реакцию, что свидетельствует об их специфичности и принадлежности к определенному роду, виду и сероварианту.

В результате определения бактерицидной и бактериостатической активности теотропина в отношении эшерихий было установлено следующее.

Вещество в дозе 5 мг/см<sup>3</sup> в течение 6 часов не оказывает на эшерихий ни бактерицидного, ни бактериостатического действия. Лишь при экспозиции от 8 до 20 часов установлено бактериостатическое действие теотропина.

Инактивант в дозе 10 мг/см<sup>3</sup>, внесенный в культуры эшерихий, вызывает задержку роста бактерий при воздействии на них в течение от 6 до 16 часов, а при экспозиции 18 и 20 часов оказывает бактерицидное действие. Вещество в дозе 12 мг/см<sup>3</sup> проявляет бактериостатическое действие при экспозиции от 2 до 12 часов. А при экспозиции от 14 до 20 часов губительно действует на эшерихии, вызывая их полную инактивацию.

Для определения полноты инактивации токсинов эшерихий белым мышам массой 16-18 г. Вводим внутрибрюшинно его 0,5 см<sup>3</sup> инаktivированных культур бактерий и вели наблюдение за животными в течение 48 часов. В течение этого срока мыши оставались подвижными, охотно принимали корм и воду, т.е. были здоровыми, что являлось свидетельством полной инактивации токсинов эшерихий теотропином.

Для установления инаktivирующей активности димерэтиленимина к культурам эшерихий добавляли инаktivант в количестве 0,1% и 0,2% и выдерживали в термостате при 37°C в течение 20 часов. Через каждые 2 часа делали высевы в МПБ, которые инкубировали в термостате. Спустя 4 часа выдерживания высевов, обнаружили, что димерэтиленимин в концентрации 0,1% вызывал прекращение роста бактерий, т.е. наступала их полная инаktivация.

При определении полноты инаktivации токсинов эшерихий димерэтиленимином было установлено, что белые мыши, которым вводили культуру бактерий в течение 5-и часового воздействия инаktivанта как в 0,1%, так и в 0,2% концентрации оставались здоровыми и живыми.

Для сравнительного анализа в опытах был использован формалин, который оказывал инаktivирующее действие на эшерихии лишь спустя 15 суток после его добавления к культурам и через 16 суток инаktivировал токсины эшерихий.

Из культур эшерихий, инаktivированных различными инаktivантами, нами были приготовлены препараты-мазки, окрашены по Граму и подвергнуты микроскопии. В поле зрения светового микроскопа морфология бактерий была типичной для рода *Escherichia*. Бактерии представляли собой граммотрицательные палочки с закругленными концами, располагались одиночно, попарно, небольшими скоплениями неопределенной формы.

**Заключение.** Исходя из результатов опытной работы, можно заключить, что теотропин, добавленный к эшерихиозным культурам в количестве 12 мг/см<sup>3</sup> при экспозиции 12 часов оказывает бактериостатическое действие, а при экспозиции 14 часов, вызывает полную инаktivацию бактерий и обезвреживание их токсинов.

Димерэтиленимин обладает способностью в концентрации 1% вызывать гибель эшерихий в течение 4-х часов контакта с ними и полностью инаktivировать их токсины в течение 5-и часов.

Формалин, добавленный к культуре эшерихий в количестве 0,3% вызывает инаktivацию бактерий в течение 15-и суточного срока воздействия, а инаktivация токсинов микроорганизмов наступает спустя 16 суток выдерживания культур при температуре 37°C.

Наиболее приемлемым инаktivантом является димерэтиленимин, т.к. вещество в течение 4-х часов оказывает бактерицидное действие на эшерихий, а в течение 5-и часов полностью инаktivирует их токсины.

**Литература.** 1. Бушужева Н.Б. Инаktivация микроорганизмов при производстве бактериальных вакцин / Н.Б. Бушужева // *Аграрная наука*. – 1998. - №1 – с.20-21. 2. *Ветеринарные препараты. Справочник* / сост. Ю.Ф. Борисович, Л.В. Кириллов, под ред. Д.Ф. Осидзе – М: Колос, 1981. – 448 с. 3. Колотилова Т.Г. Инаktivация сальмонелл и пастерелл димером этиленимина : автореф. дис. канд. вет. наук / Т.Г. Колотилова. – Владимир, 2001 – 21 с. 4. *Курс лекций по частной ветеринарной микробиологии : учебно-методическое пособие для студентов по специальности "Ветеринарная медицина" и "Ветеринарная санитария и экспертиза"* / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий, В. Н. Алешкевич [и др.] ; Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины". – Витебск : Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2015. – 138 с. 5. Медведев, А. П. Инаktivация сальмонелл димером этиленимина / А. П. Медведев, Т. П. Иванова, С. В. Даровских //

Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2005. – Т. 41. – № 2-1. – С. 36-37. 6. Определение микробиоценоза кишечного тракта животных в норме и при дисбактериозах / В.Н.Алешкевич [и др.]-рекомендации /УО ВГАВМ, Витебск, 2017. - 40 с. 7. Сывороточные и вакцинные препараты для профилактики и терапии инфекционных заболеваний животных / Е.В. Сусский [и др.], – Армавир, 2013. - с. 338. 8. Тугаринов О.А. Средства и методы специфической профилактики, лечения и диагностики эшерихиоза животных, дис.. на соиск. Уч. Ст. докт. Вет. наук. – Москва, 1998. – 416 с. 9. Частная эпизоотология : учебное пособие для студентов вузов по специальности "Ветеринарная медицина" / В. В. Максимович, Н. В. Саница, В. Ф. Багрецов [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2010. – 628 с.

## ГЕНЕТИКА В СОВРЕМЕННОМ МИРЕ

**ЛАРИНА О.В., ШАПОШНИКОВ И.Т., БАХТИНА А.В., ВОЕВОДИН А.В., СУСЛОВ Д.Ю.**

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I,  
г. Воронеж, Российская Федерация

*Родоначальником геномной селекции является маркерная селекция. Маркерная селекция – это использование маркеров для маркирования генов количественного признака, что дает возможность установить наличие или отсутствие в геноме определенных генов (аллелей генов). Известно, что большая часть хозяйственно ценных селекционных признаков имеет полигенный характер, т.е. контролируется множеством генов. При этом изменчивость признаков под воздействием факторов внешней среды может достигать 50 %. В то же время имеются гены или группа генов, а точнее аллели этих генов, вклад которых в проявление того или иного признака продуктивности при любых условиях среды более значителен и имеет четко выраженный эффект. Такие гены называются основными генами локусов количественных признаков QTL (Quantitative Trait Loci). Молекулярно-генетические методы позволяют определить различия между животными по аллельным вариантам в локусах ДНК, которые или непосредственно влияют на проявление признака, либо связаны с QTL, что делает возможным картировать эти локусы и проводить отбор животных непосредственно по генотипам, т.е. по генетическим маркерам. Применение ДНК-маркеров для ускорения решения селекционных задач получило название «селекция с помощью маркеров или маркер-зависимая селекция (MAS-marker-assisted selection)». **Ключевые слова:** маркер, селекция, гены, молекулярно-генетические методы, генетика, геномика, внутригенетика, эпигеномика*

## GENETICS IN THE MODERN WORLD

**LARINA O.V., SHAPOSHNIKOV I.T., BAKHTINA A.V., VOEVODIN A.V., SUSLOV D.YU.**

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I, Voronezh, Russian Federation

*The ancestor of genomic selection is marker selection. Marker selection is the use of markers to mark genes of a quantitative trait, which makes it possible to establish the presence or absence of certain genes (gene alleles) in the genome. It is known that most of the economically valuable breeding traits have a polygenic character, i.e. they are controlled by a multitude of genes. At the same time, the variability of signs under the influence of environmental factors can reach 50%. At the same time, there are genes or a group of genes, or rather alleles of these genes, whose contribution to the manifestation of a particular sign of productivity under any environmental conditions is more significant and has a clearly pronounced effect. Such genes are called the main genes of quantitative trait loci QTL (Quantitative Trait Loci). Molecular genetic methods make it possible to determine differences between animals by allelic variants in DNA loci, which either directly affect the manifestation of the trait, or are associated with QTL. **Keywords:** marker, selection, genes, molecular genetic methods, genetics, genomics, intragenetics, epigenomics*

Благодаря трудам Ч. Дарвина и Г. Менделя XIX век в биологии называют эрой Эволюции и Генетики, открытие структуры молекулы ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком и расшифровка её первичной последовательности предопределили XX веку быть эрой Геномики, а наступившему XXI веку предрекают стать эрой Эпигенетики.

**Геномика.** Геномика – раздел генетики, который изучает геномы и отдельные гены на молекулярном уровне, их структуру и функции, а также их использование в геномной инженерии, геномной терапии и биотехнологии.